有用分解菌によるダイオキシン汚染土のバイオレメディエーション（その１）

－ CA10 株 ,DBF63 株を用いたモデル汚染土の浄化試験－

四本瑞世　辻　博和　石川洋二
岡田俊也　井出一貴

Bioremediation of Dioxin Contaminated Soil by Dioxin-Degrading Bacteria (Part 1)

－Degradation of Dioxin by *Pseudomonas* sp. CA10 and *Terrabacter* sp. DBF63 in Model Soil Sample－

Mizuyo Yotsumoto　Hirokazu Tsuji　Yoji Ishikawa
Shunya Okada　Kazuki Ide

Abstract

A method for degrading of dioxin by Pseudomonas sp. CA10 and Terrabacter sp. DBF63 has been developed. In this study, we investigated the degradability of dioxin by strain CA10 and DBF63 and suitable conditions for bioremediation of dioxin-related compounds in a model soil sample.

When the strain CA10 was inoculated into model soil samples, 56～80% of 2,3-DCDD(1ppm) was degraded within 5 days at a soil density of 10^9CFU/g . By repeated inoculations of CA10 every 2 days with 10^9CFU/g of soil, more than 90% of 2,3-DCDD was degraded .

However, when the strain DBF63 was inoculated into model soil samples, 90% of 2,8-DCDF(1ppm) was degraded within 3 days at a soil density of 10^9CFU/g .

概要

ダイオキシンと化学構造の類似した有機塩素化合物を分解できる細菌２種類（*Pseudomonas* sp.CA10 株、*Terrabacter* sp.DBF63 株）を用いて，ダイオキシン汚染土を浄化する工法の開発を進めている。本報告では，ダイオキシンのモデル汚染土を用いて菌の添加量，添加方法等の分解処理条件を検討し，以下の知見を得た。

Pseudomonas sp.CA10 株において，1ppm 濃度の２塩素化ダイオキシン汚染土に，カルバゾールで培養し，培養後カルバゾールを除去した菌体 10^9CFU/g-soil を添加したところ，５日間で汚染土の 56～80%が分解し，菌を繰り返し添加すると 90%以上が分解した。

一方，*Terrabacter* sp.DBF63 株では，1ppm 濃度の２塩素化ジベンゾフラン汚染土に，ジベンゾフランで培養した菌体 10^9CFU/g-soil をジベンゾフランを含んだ培養液の状態で添加したところ，３日間の処理で汚染土の 90%が分解した。

１．はじめに

環境汚染の中でも，ダイオキシンによる大気あるいは土壌の汚染は深刻であり，現在大きな社会問題となっている。

一般に，ダイオキシンとは，２つのベンゼン環が２つの酸素原子でつながれたジベンゾ-*p*-ダイオキシン（DD）とその塩素化合物の総称（ポリ塩化ジベンゾ-*p*-ダイオキシン，PCDD；Fig.1）であるが，構造類似のポリ塩化ジベンゾフラン（PCDF；Fig.1）及び PCB（PCB；Fig.1）の一部も含まれる。ダイオキシンの毒性は，急性毒性，発がん性など多岐にわたり深刻である為，我が国では，平成11年7月に，「ダイオキシン類対策特別措置法」が成立し，規制が強化された。土壌基準は，1000pg-TEQ/g（TEQ とは，ダイオキシン類それぞれの同族体の毒性を，2,3,7,8-四塩素化ダイオキシンに換算して合計したもの）である。汚染土の処理技術として，燃焼法，アルカリ触媒分解法，超臨界水酸化分解法等の物理化学的手法が検討されている。しかし，これらの処理法の費用は高額であるので，バイオレメディエーション法に期待が寄せられている。

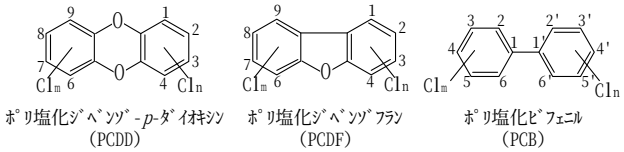

Fig. 1　ダイオキシン類の化学構造式
Structures of PCDD,PCDF,and PCB

本報では，バイオレメディエーション法によるダイオキシン汚染土壌の浄化の可能性をモデル汚染土壌で検討し，菌の添加量，添加方法等について有用な知見が得られたので報告する。

2．好気性細菌によるダイオキシンの分解機構

ダイオキシン類は難分解性であり，かつ土壌中の有機物などに強く吸着される為，環境中に長期に安定して存在する。しかし，このような難分解性のダイオキシン類でも微生物分解の試みがなされており，今までに白色腐朽菌による分解，好気性細菌による酸化分解，嫌気性細菌による脱ハロゲン化が報告されている。

好気性細菌によるダイオキシンの分解では，これまでに，塩素数が多いダイオキシンを唯一の炭素源として生育する菌の報告はなく，塩素置換のないDD及びジベンゾフランを唯一の炭素源として生育する菌や，他の炭素源を資化すると同時に共代謝（コメタボリズム）して分解する菌について報告されている。

今回，我々がダイオキシン汚染土の浄化に用いる微生物は，東京大学大森研究室で単離されたカルバゾールやジベンゾフランを分解できる細菌２種類（*Pseudomonas* sp.CA10株，*Terrabacter* sp.DBF63株）であり，これらダイオキシンの分解機構は以下の通りである。

CA10株はダイオキシンと構造類縁物であるカルバゾールを分解できる。カルバゾールの最初の分解に関与する酸化酵素（Carbazole 1,9a-dioxygenase）によって，DDやジベンゾフランの酸素原子と結合している炭素原子とそれに隣接する炭素原子に酸素原子が1個ずつ水酸基として導入され，自発的な環開裂がおこり分解することが明らかとなっている[1)]。

ジベンゾフラン資化菌であるDBF63株においても，最初に酸素を添加する酵素（Dibenzofuran 4,4a-dioxygenase）によってCA10株と非常に類似した経路でジベンゾフランを分解代謝する[2)]。

これら酸化酵素は，基質特異性が低いいため，塩素化したダイオキシン類に対しても同様に酸素を添加し分解することができると予想される。

今回は，毒性の面から規制の対象になっていない２塩素化ダイオキシン（2,3-dichlorodibenzo-*p*-dioxin と 2,8-Dichlorodibenzofuran）を基質として作成したモデル汚染土を用いて，菌の添加量，添加方法等の分解処理条件の検討を行った。

3．CA10株によるダイオキシン分解の処理条件の検討

3.1　実験内容

CA10株を用いてダイオキシンを分解処理する際，生育基質であるカルバゾールが必要であることは上述した。カルバゾールを環境中に放出することは，新たな環境汚染を引き起こす可能性がある為，あらかじめカルバゾールで菌量を一定量増殖させ，分解酵素を誘導させた後，カルバゾールを除去した菌体を用いて分解させる方法が考えられる。

そこで，まずカルバゾールで生育させる日数とダイオキシン分解力との関係を調べ，分解処理に使用する菌の最適な培養期間を検討した。次に，ダイオキシンのモデル汚染土を用いて，菌の添加量の違い，添加方法の違いによるダイオキシン分解量を調べ，分解処理条件を検討した。

3.2　方法

3.2.1　菌の培養法　ダイオキシン分解量の測定方法

CA10株の培養には，カルバゾールを唯一の炭素源となるように0.1%添加した無機栄養塩培地を用いた。あらかじめ培養した菌液10mlを1000mlの新しい培地に植え継ぎ，30℃で振とう（120rpm）培養した。

培養12時間後，24時間後，48時間後，120時間後に，培養液の一部をサンプリングして，生菌数をプレートにて測定した。残りの培養液を遠心により集菌し，無機栄養塩培地で2回洗浄してカルバゾールを取り除いた後，菌体量が約10^6～10^9 CFU/mlとなるように同様な培地で懸濁しダイオキシン分解試験に供した。

ダイオキシン基質として，2,3-dichlorodibenzo-*p*-dioxin (2,3-DCDD)を使用した。100ml容坂口フラスコに洗浄済み菌懸濁液を5ml加え，あらかじめDMF (Dimethyl Formamide)に溶解させておいた2,3-DCDDを1μgとなるよう添加し，振とう (120 rpm,30℃) させることにより5日間反応させた。添加菌体量は１フラスコあたり10^{10} CFUとし，すべて３連で行った。

反応終了後，残存する2,3-DCDDを酢酸エチルで抽出し，無水硫酸ナトリウムで脱水後，遠心エバポレーターで濃縮した。この濃縮サンプルをガスクロマトグラフィー／マススペクトロメトリー（JMS-Automass 150 GC-MS system 以下GC-MS）で定量した。

3.2.2　モデル汚染土を用いた分解試験　関西地方で一般に分布するマサ土（花崗岩の風化土）の風乾（＜2mm）したものについて，最大容水量の70%に水分調整後，2,3－DCDDを１μg/g－soil（1ppm）となるように添加し「ダイオキシンモデル汚染土」を作成した。これを坂口フラスコに1gずつはかりとった後，3.2.1項と同じ手段で集菌，洗浄した菌懸濁液を5ml添加し，スラリー（1：5）状態にした後，振とうさせることにより反応させた。

その際，菌の添加量の効果は，添加菌体量を10^7CFU/g-soilと10^9CFU/g-soilの２条件設定し，ダイオキシン分解量を経時測定することで把握した。

また，菌の添加方法の効果は，試験開始時のみに菌を添加する条件と，試験開始時に加え，試験開始後2日おきに6回繰り返し添加する条件を設定し，ダイオキシン分解量を経時測定することで把握した。なお，1回あたりの添加菌体量は10^9CFU/g-soilとした。

3.3　結果及び考察

3.3.1　ダイオキシン分解処理に使用するCA10株の最適な培養期間　CA10株のカルバゾールを唯一の炭素源とした際の生育曲線をFig.2に，カルバゾール培養時間とダイオキシン分解活性との関係をFig.3に示した。

Fig.2に示すように，生菌数は，時間経過とともに増大し、48時間でピークの約３×10^9CFU/mlに達した後，減少

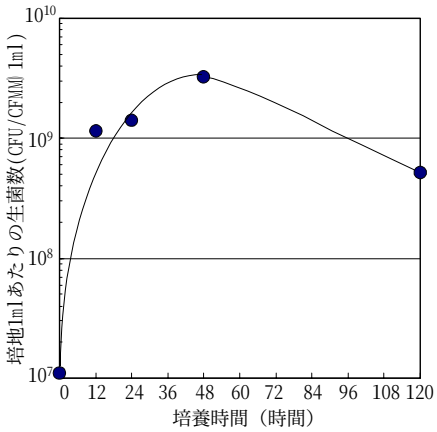

Fig. 2　CA10株のカルバゾール上での生育曲線
Growth Curve of Strain CA10 in CNFF Medium Containing 0.1% Carbazole

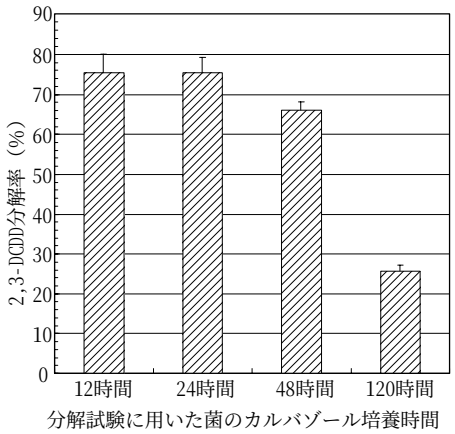

Fig. 3　培養時間とダイオキシン分解活性の相関
Relations Between Time of Cultivation and Degradability of 2,3-DCDD

している。生育基質であるカルバゾールは，水への溶解度が1.251 μg/mlと難溶である為，培養直後から24時間後まで白い結晶が目視で確認できていたが，48時間後には確認できなくなった。

次に，2,3-DCDD分解活性は，Fig.3より，カルバゾールで12時間から48時間培養した菌体を用いた場合，66～75%分解しているのに対し，120時間培養した菌体を用いた場合には分解率が26%と，分解活性が大幅に低下した。

これより，培養12時間以降48時間まではカルバゾール誘導によりダイオキシン分解酵素が発現していること，カルバゾールのない状態で菌を培養すると，酵素活性はすぐに低下することが明らかとなった。培養12時間後及び24時間後の菌体に比べ，48時間は分解率が10%低い結果を示したが，ダイオキシン汚染土にカルバゾールを含む菌体を添加することは，新たな汚染物質の添加となることを考慮すると，CA10株の最適な培養期間は，GC-MSでカルバゾールの残存が確認されなくなった48時間と判断した。

3.3.2　CA10株の菌体量の添加効果　Fig.4に，CA10株の添加量が10^9CFU/g，10^7CFU/gの際の2,3-DCDD残存率を示した。10^9CFU/gの添加量において，残存率は1日で40%まで低下した後，徐々に低下し，5日目以降20%でほぼ横ばいになった。10^7CFU/gでは，残存率は時間経過とともに比較的緩やかに低下し，7日目で54%に至った後，ほぼ横ばいになった。

これより，ダイオキシン濃度が1ppmであれば，10^9CFU/gの菌体量を添加し，5日間処理することで，その80%を分解できることが判明した。ダイオキシンの分解は添加直後から5～7日間で起こり，それ以降は進行しないことがわかった。この現象は，CA10株が反応系に10^7CFU以上存在しても，カルバゾール誘導性の酵素群の活性低下が短期間で起こることに起因すると推察され，更に分解を継続させる為には，新しい菌の追添加が必要であることを示唆している。

3.3.3　CA10株の繰り返し添加によるダイオキシン分解効果　Fig.5に，CA10株を2日おきに繰り返し添加した場合と，試験開始時のみに添加した場合について，2,3-DCDD

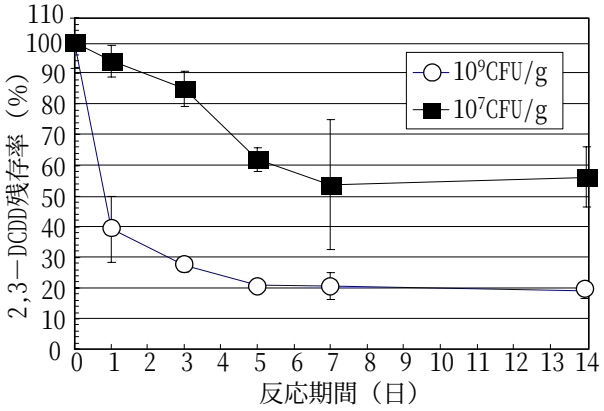

Fig. 4　CA10株の菌体量の添加効果
Degradation of 2,3-DCDD Contaminated Soil

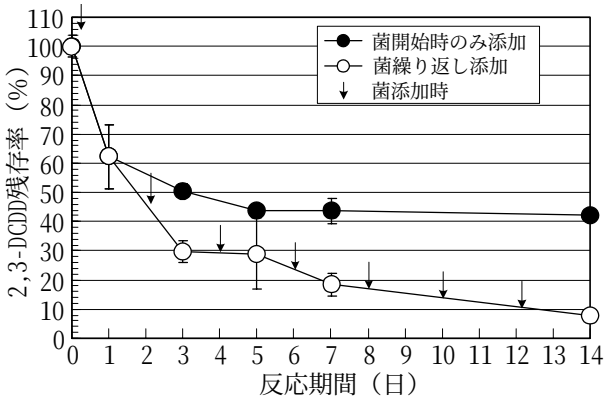

Fig. 5　CA10株の繰り返し添加による2,3-DCDD残存率
Degradation of 2,3-DCDD Contaminated Soil by Repeated Inoculations of strain CA10

残存率の経時変化を示した。

これより，試験開始時のみに菌を添加した場合，残存率は1日で60%に低下した後，緩やかに低下し，5日目以降44%前後で推移している。一方，2日おきに菌を添加した場合，残存率は菌添加毎に低下し，処理7日目すなわち試験開始時を含めた計4回の菌添加で18%，14日目すなわち7回の菌添加で10%以下となった。

これより，菌のくり返し接種によって，ダイオキシンは効率的に分解できることが判明した。

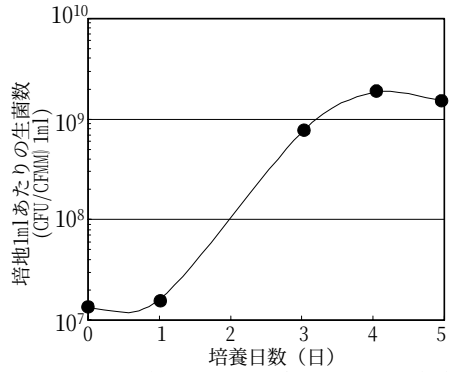

Fig. 6　DBF63株のジベンゾフラン上の生育曲線
Growth Curve of Strain DBF63 in CNFF Medium Containing 0.1% Dibenzofuran

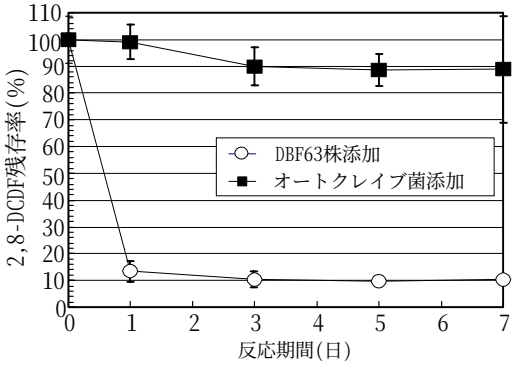

Fig. 7　DBF63株添加による2,8-DCDF残存率
Degradation of 2,8-DCDF Contaminated Soil by Strain DBF63

4．DBF63株によるダイオキシン分解の処理条件の検討

4.1　実験内容

DBF63株は，ダイオキシンの1種であるジベンゾフラン分解菌である為，増殖過程にある菌体と生育基質であるジベンゾフランを添加することで酵素活性が維持され，ダイオキシンの分解が効率よく行えると考えられる。

そこで，本章では，DBF63株の増殖過程にある菌体を用いてダイオキシンの分解活性を検討した。

4.2　方法

DBF63株の培養には，ジベンゾフランを唯一の炭素源となるように0.1%添加した無機栄養塩培地を用いた。操作は，3.2.1項と同様で，30℃で振とう培養し，培養5日後まで経時的に生菌数を測定した。

モデル汚染土を用いた分解試験は，ダイオキシン基質として，2,8-Dichlorodibenzofuran (2,8-DCDF)を使用し，3.2.2項と同様に作成した1ppmのモデル汚染土1gに対して，ジベンゾフランで2日間培養したDBF63株の菌液を5ml添加し，振とうさせることにより反応させた。試験開始後，経時的に2,8-DCDF残存量を3.2.1項と同様な方法で測定した。試験開始時の菌体添加量は，7.8×10^8CFU/g-soilとし，対照として，オートクレイブした菌を添加した区を設けた。

4.3　結果及び考察

Fig.6に，DBF63株のジベンゾフランを唯一の炭素源とした際の生育曲線を示した。これより生菌数は，培養1日後では初期値と変らず約1×10^7CFU/mlであり，4日後に1.86×10^9CFU/mlとピークに達し，それ以降減少した。

Fig.7に，ジベンゾフランで2日間培養した菌体を添加した場合と，オートクレイブした菌を添加した場合における2,8-DCDF残存率の経時変化を示した。この場合，処理7日目においても，2,8-DCDF残存率は約90%と経時的な変化が見られなかったのに対し，DBF63株を添加した場合においては，その残存率は処理1日で14%まで急減した後，ほぼ横ばいとなり，7日目で10%を示した。その際，生育基質であるジベンゾフランは，処理3日目までGC-MSで確認され，それ以降確認されなかったことを考慮すると，3日目以降の分解活性の低下は，ジベンゾフランの消失に起因するものであり，ジベンゾフランが存在すれば，更に分解が進行すると考えられる。

5．まとめ

ダイオキシンのモデル汚染土を用いた浄化試験より，以下のことが明らかとなった。

CA10株では，菌添加量が10^9CFU/g-soil，5日間の処理で，2,3-DCDD汚染土の56～80%が分解し，菌を繰り返し添加すると90%以上が分解した。DBF63株では菌体量が10^9CFU/g-soilでジベンゾフランを含んだ培養液を添加し，3日間の処理で，2,8-DCDF汚染土の90%が分解した。

現在，両株における実際のダイオキシン汚染土，汚染焼却灰への適用試験を開始している。

2種類の有用分解菌の適用性を確認した上で，具体的な工法を検討する予定であり，これらの結果は追って報告する。

謝　辞

本研究は，東京大学大森研究室で単離された細菌2種類を用い、NEDOの平成10年度即効型提案公募事業として，東京大学と共同で実施したものである。多大なるご指導を頂いた大森俊雄教授，ならびに関係各位に深謝いたします。

参考文献

1）Nojiri, H., et al.：Diverse oxygenations catalyzed by carbazole 1,9a-dioxygenase from *Pseudomonas* sp. strain CA10, J. Bacteriol., Vol.181, pp3105-3113, (1999)

2）Monna,L., et al.：Microbial degradation of dibenzofuran, fluorene, and dibenzo-*p*-dioxin by *Staphylococcus auriculans* DBF63, Appl. Environ.Microbiol.,Vol.59, pp.285-289, (1993)